

Кишечная микробиота — новый игрок в патогенезе атеросклероза

Егшатын Л. В., Ткачева О. Н., Бойцов С. А.

ФГБУ “Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины” Министерства здравоохранения Российской Федерации. Москва, Россия

В статье представлен обзор современной литературы, обобщающий экспериментальные и клинические данные о роли кишечной микробиоты в развитии атеросклероза. Микрофлора кишечника является своеобразным маркером состояния макроорганизма, реагируя на возрастные, физиологические, диетические, климато-географические факторы изменением качественного и количественного составов. Показано, что L-карнитин и холин, получаемые с пищей, используются микрофлорой кишечника для синтеза триметиламина, который быстро окисляется флавиномонаоксигеназой в печени до триметиламин-N-оксида, вызывающего развитие ате-

росклероза и повышающего риск развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: кишечная микробиота, атеросклероз, холин, L-карнитин, триметиламин-N-оксид.

Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2014; 13(6): 56–61
<http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2014-6-56-61>

Поступила 04/09-2014

Принята к публикации 28/10-2014

Gut enterobiota — a new player in atherosclerosis pathogenesis

Egshatyan L. V., Tkacheva O. N., Boytsov S. A.

FSBI State Scientific-Research Centre for Preventive Medicine of the Ministry of Health of Russian Federation. Moscow, Russia

The article provides a review of contemporary literature, which generalizes experimental and clinical data on the role of gut microbiota in atherosclerosis development. Gut microflora can be named a marker of the macroorganism condition, reacting on age-related, physiological, dietic, climatogeographic factors with its changes of qualitative and quantitative compounds. It was shown that L-carnitine and choline being received with food, are utilized by microflora to synthesize trimethylamine, which then rapidly oxydized by flavinmonooxygenase of liver to

trimethylamin-N-oxide, that causes atherosclerosis development and increases risk of cardiovascular diseases.

Key words: gut microbiota, atherosclerosis, choline, L-carnitine, trimethylamine-N-oxide.

Cardiovascular Therapy and Prevention, 2014; 13(6): 56–61
<http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2014-6-56-61>

КМ — кишечная микробиота, ССС — сердечно-сосудистые события, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ТМА — триметиламин, ТМАО — триметиламин-N-оксида.

Введение

Известно, что сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), связанные с атеросклерозом, являются основными причинами заболеваемости, инвалидности и смертности в развитых странах. Согласно оценкам Всемирной Организации Здравоохранения, в ближайшее десятилетие они угрожают стать основной причиной смертности в развивающихся странах. При этом эпидемия ССЗ разворачивается на фоне больших успехов в их диагностике и лечении [1]. Предложено много гипотез, объясняющих происхождение и прогрессирование атеросклеротического процесса, однако до настоящего времени ни одна из них не является окончательно доказанной.

Предположение о возможной роли воспалительного процесса в патогенезе атеросклеротического поражения было высказано еще в середине XIX века Virchow R. В начале прошлого века Osler W. сформулировал инфекционную гипотезу атеросклероза. Большинство исследователей склоняется к тому, что развитие атеросклероза представляет собой воспалительный процесс в сосудистой стенке, ключевую роль в котором играют макрофаги [2] и атерогенные классы липопротеинов, которые являются потенциально провоспалительными факторами.

В различных исследованиях показано, что в развитых странах риск развития ССЗ обусловлен высоким потреблением мяса, что связывали с большим содержанием насыщенных жиров и холесте-

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

Тел./факс: +7 (926) 860-79-55

e-mail: lilit.egshatyan@yandex.ru

[Егшатын Л. В.* — к.м.н., м.н.с. отдела изучения старения и профилактики возраст-ассоциированных заболеваний, Ткачева О.Н. — д.м.н., профессор, первый заместитель директора по научной и лечебной работе, Бойцов С.А. — д.м.н., профессор, директор].

рина [3,4]. Однако недавно был проведен мета-анализ, который не выявил ассоциации между приемом насыщенных жиров и риском развития ССЗ, указывая на существование иных факторов, приводящих к патологии сердечно-сосудистой системы [5].

Задуматься о возможной связи L-карнитина с развитием атеросклероза заставило открытие 2011г, показавшее связь метаболизма холина/фосфатидилхолин, лецитина — структурных аналогов L-карнитина с патогенезом атеросклероза и ССЗ [6]. Главным источником холина и L-карнитина является пища животного происхождения, особенно яйца, молоко, красное мясо.

Как известно, кишечная микробиота (КМ) является своеобразным индикатором состояния макроорганизма, реагируя на возрастные, физиологические, диетические, климатогеографические факторы изменением качественного и количественного состава [7]. Ранее была описана роль КМ в нарушениях обмена веществ, в развитии инсулинорезистентности, сахарного диабета 2 типа, гиперхолестеринемии, ожирении и т.д. [8, 9]. Однако об участии КМ в процессах атеросклероза у людей заговорили недавно [6].

Роль КМ в атерогенезе

Исследования последних лет показали, что холиновая половина фосфатидилхолина насыщенных жиров пищи используется некоторыми кишечными бактериями для синтеза интермедиата триметиламина (ТМА), который быстро абсорбируется и окисляется в печени ферментами из семейства флавинмонооксигеназы (FMO) до триметиламин-N-оксида (ТМАО), вызывающего развитие атеросклероза [10].

Использование кишечными бактериями триметиламинной группы холина для синтеза ТМА ставит вопрос о существовании подобных метаболических путей для аналогичных соединений, включающих эту группу. Одна из таких молекул — L-карнитин. Учитывая сходство в структуре между L-карнитином и холином (рисунок 1) была выдвинута гипотеза о том, что диетический L-карнитин у людей, как холин и фосфатидилхолин, может стать источником ТМА и ТМАО и быть связанным с риском развития атеросклероза [10].

Возникшая гипотеза о связи продукции ТМАО из L-карнитина подтвердилась исследованиями 2013г [10], хотя предшествующие эксперименты на крысах не выявляли такой связи [11]. То, как именно ТМАО связан с ускоренным развитием атеросклероза пока остается неизвестным [10].

Впервые L-карнитин был выделен из экстракта мышечной ткани двумя русскими учеными — В.С. Гулевичем и Р.З. Кримбергм в 1905г, а в 1960г был синтезирован Дж. Бремером. Несмотря на то, что эукариоты могут эндогенно синтезировать

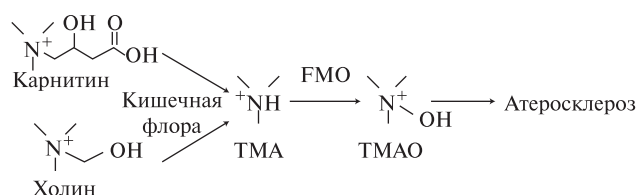


Рис. 1 Схема синтеза ТМАО, приводящего к развитию атеросклероза [10].

L-карнитин, только прокариотические организмы могут его катаболизировать [12].

Исследование влияния L-карнитина на атерогенез на моделях животных

Для оценки влияния L-карнитина на степень атеросклероза в присутствии и отсутствии синтеза ТМАО проведено исследование на моделях животных [10].

В этом исследовании, с 4-недельного возраста 4 группы мышей получали питание определенного типа:

- обычное,
- с повышенным содержанием L-карнитина,
- с добавлением антибиотиков
- с повышенным содержанием L-карнитина и добавлением антибиотиков.

Сравнение ткани корня аорты у мышей по достижении 19-недельного возраста выявило двойное увеличение области атеросклеротического повреждения при добавлении в корм L-карнитина (рисунок 2). У мышей, получающих L-карнитин в комплексе с антибиотиками, нарушений не возникало. Сделан вывод, что причиной развития сердечно-сосудистых нарушений являются определенные бактерии, которые участвуют в образовании ТМАО, уровень которого значительно возрастает при потреблении L-карнитина и коррелирует с развитием атеросклероза. Примечательно также, что развитие атеросклеротических поражений у мышей происходило в отсутствии изменений в составе и содержании липидов, липопротеинов, уровня глюкозы и инсулина. Более того, у таких мышей не удалось выявить даже признаков ожирения.

Таким образом, исследования на мышах подтверждают связь повышенных уровней L-карнитина и ТМАО с развитием ССЗ [10].

Интересен еще один факт — отмечено значительное увеличение плазменного уровня L-карнитина у мышей при добавлении L-карнитина и антибиотиков (по-видимому, в результате уменьшенной способности КМ катаболизировать карнитин), однако эти повышенные уровни не показали усиления процесса атеросклероза [10].

Изучение влияния L-карнитина на атерогенез в клинических исследованиях

Два независимых клинических исследования также показали, что постоянный избыток L-карни-

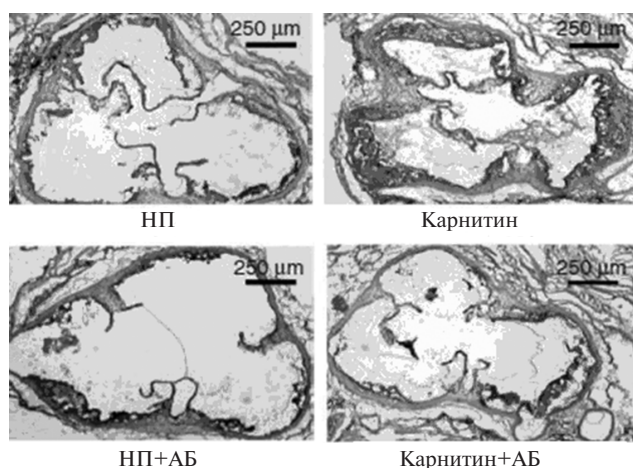


Рис. 2 Срезы корня аорты 19-недельных мышей. Окраска гематоксилином.

Примечание: НП — нормальное питание, АБ — антибиотик.

тина и холина в пище приводит к изменениям состава кишечной микрофлоры, способствуя размножению бактерий, участвующих в синтезе ТМАО [10, 13]. Также в этих исследованиях показано, что антибиотики широкого спектра действия временно подавляют выработку ТМАО микробиотой, что доказывает причастность КМ к синтезу этих метаболитов.

В одном из исследований [13] здоровые взрослые без хронических заболеваний (сердца, почек, легких, крови) и активной инфекции, не принимающие антибиотики и пробиотики в течение месяца до включения в исследование, подверглись изучению диетического фосфатидилхолина (в плазме и суточной моче) до и после приема двух больших яиц сваренных вкрутую (~250 мг холина в 1 яйце) вместе с 250 мг фосфатидилхолина маркированного дейтерием (d9-фосфатидилхолин). В другом исследовании [10] у людей изучали диетический L-карнитин до и после приема 8 кусков мясного стейка (~180 мг L-карнитина) и 250 мг L-карнитина меченного изотопом (d3-(метил)-L-карнитин). Как в первом, так и во втором исследовании по сравнению с исходным уровнем, наблюдалось постпрандиальное повышение уровня ТМАО и меченных d9- и d3-ТМАО, соответственно, как в плазме, так и в суточной моче.

Для исследования потенциального вклада КМ в синтез ТМАО из диетического фосфатидилхолина и L-карнитина, пациентам этих исследований далее назначали антибиотики широкого спектра действия (метронидазол 500 мг 2 раза в сут. и ципрофлоксацин 500 мг/сут. [10]) в течение 1 нед. для подавления активности КМ. Выявлено, что подавление КМ приемом антибиотиков привело к почти полному снижению уровней как эндогенного, так и меченных d9- и d3-ТМАО. Однако после отмены антибиотиков и восстановления кишечной флоры через

≥1 мес., выявлено повышение уровней эндогенного и меченных d9- и d3-ТМАО в плазме и моче, что связано с реколонизацией кишечника и указывает на важную роль КМ [10, 13].

Степень восстановления уровня ТМАО в плазме до предантибиотического уровня, была переменной, что сопоставимо с данными, описывающими разную степень восстановления КМ после прекращения курса антибиотикотерапии [14].

Существование корреляции между уровнями ТМАО в крови и суточной моче, свидетельствует в пользу его эффективного клиренса. Таким образом, эффективный механизм выделения метаболитов L-карнитина может обеспечить защиту организма от чрезмерного накопления ТМАО [10]. Несмотря на важность ограничения диетического фосфатидилхолина и L-карнитина, нужно отметить, что холин и карнитин не должны быть полностью исключены из рациона питания, т.к. это приведет к заболеваниям, ассоциированным с их дефицитом.

Синтез ТМАО и риск развития ССЗ у веганов/вегетарианцев и людей, следующих обычной диете

В исследовании [10] показано, что возможность синтезировать ТМАО (эндогенный и d3-меченный) после приема пищи L-карнитина разная среди разных когорт людей. Выявлено, что синтез ТМАО (или его d3-меченного аналога) после потребления мясного стейка и L-карнитина (или d3-метил карнитина) незначителен у веганов (>5 лет отказывающихся от продуктов животного происхождения), в отличие от людей, регулярно потребляющих красное мясо.

Сниженное потребление L-карнитина и холина у веганов и вегетарианцев не дает развиваться бактериям, синтезирующим ТМАО, и даже при включении L-карнитина в их рацион, уровень ТМАО в плазме крови и моче остается низким [10].

До проведения этих исследований, сокращение риска развития атеросклероза у веганов/вегетарианцев, по сравнению с людьми, следующих обычной диете связывали со снижением уровня диетического холестерина и насыщенных жиров [15]. Однако данные этих исследований показывают, что низкий уровень ТМАО и есть основная причина хорошего состояния сердечно-сосудистой системы у веганов и вегетарианцев.

Статистика показывает более низкую частоту ССЗ [16] и сокращение риска смерти на 29% от ишемии сердца у веганов/вегетарианцев [17]. Эксперименты также свидетельствуют о том, что соблюдение сбалансированной растительной диеты приводит к снижению артериального давления, уровня холестерина в крови и риска возникновения атеросклероза [17-19].

В одном из исследований группе пациентов с атеросклерозом был предложен полный переход

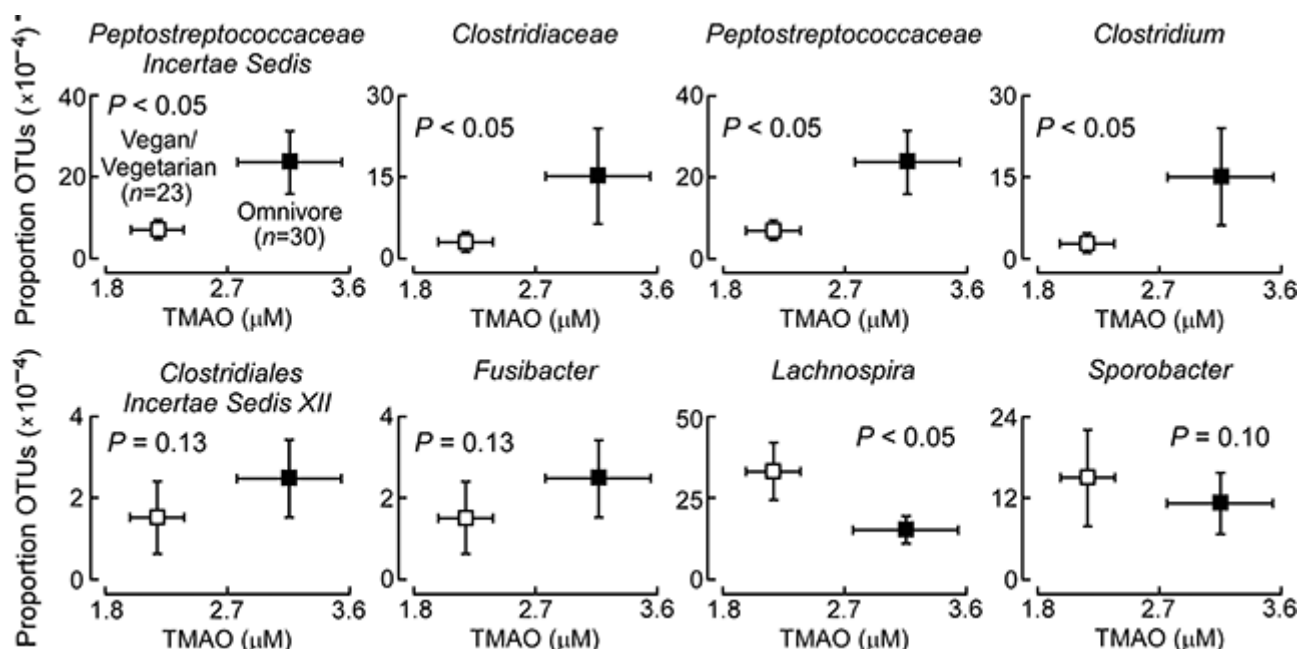


Рис. 3 Плазменный уровень ТМАО и таксономический анализ у веганов/вегетарианцев и людей, регулярно потребляющих красное мясо [10].

на растительную пищу. Через год у 82% участников группы наблюдалось улучшение состояния сосудов [20]. Повторение эксперимента приводило к сходным результатам [21].

Показано, что L-карнитин и холин, содержащие липиды, составляют ~2% “западной” диеты [22, 23]. Рандомизированное, диетическое исследование в течение 4,8 лет показало 30% снижение сердечно-сосудистых событий (ССС) у людей, потребляющих средиземноморскую диету, по сравнению с людьми, следующих обычной диете [24].

Синтез ТМАО, ассоциированный с таксономическими группами КМ

Так как пищевые привычки связаны со значительными изменениями КМ, были проанализированы образцы кала для идентификации микроорганизмов с использованием метагеномного подхода (ген 16S рРНК) у веганов/вегетарианцев (n=23) и у людей, следующих обычной диете (n=30). Параллельно, были определены уровни сывороточных ТМАО, L-карнитина и холина. Глобальный таксономический анализ показал значительные ассоциации с уровнями ТМАО (p=0,03), но не L-карнитином (p=0,77) или холином (p=0,74) (рисунок 3) [10].

Существуют всего три энтеротипа, каждый из которых определяется характерным набором и соотношением доминирующих и минорных видов микроорганизмов. Маркерным признаком первого энтеротипа является высокая концентрация бактерий рода *Bacteroides*, второго — бактерий рода *Prevotella*, характерным же признаком третьего энтеротипа является присутствие в составе МК повышенного числа бактерий рода *Ruminococcus*.

После классификации пациентов в известные энтеротипы [25] выявлено, что при доминировании бактерий рода *Prevotella* наблюдались более повышенные (p<0,05) уровни ТМАО, чем у пациентов с энтеротипом, где доминировали бактерии рода *Bacteroides* (рисунок 4).

С целью выявления существующей связи кишечного метагенома с атеросклерозом сосудов, исследовали фекальный метагеном у 12 пациентов с симптоматическим атеросклерозом и у 13 пациентов из группы контроля без выраженных изменений сонных артерий [26]. Выявлено, что различия в метагеноме не были связаны с курением, сахарным диабетом или индексом массы тела. Пациенты с атеросклерозом относились к энтеротипу *Ruminococcus*. Было показано, что метагеном пациентов с атеросклерозом был обогащен генами, связанными с биосинтезом пептидогликанов, которые могут внести вклад в развитие симптоматического атеросклероза через врожденную иммунную систему. Однако увеличенное количество этих генов не может быть объяснено исключительно увеличением количества грамположительных бактерий, потому что и грамположительные, и грамотрицательные бактерии имеют пептидогликан. Большие грамположительные группы бактерий, такие как *Eubacterium* и *Roseburia* были выявлены в группе контроля. При атеросклерозе чаще существовал третий энтеротип, для которого характерно присутствие большого количества бактерий рода *Ruminococcus* и *Collinsella*, ответственных за синтез компонента бактериальной стенки пептидогликана — индуктора воспаления. А у здоровых людей преобладали бактерии рода *Eubacterium*,

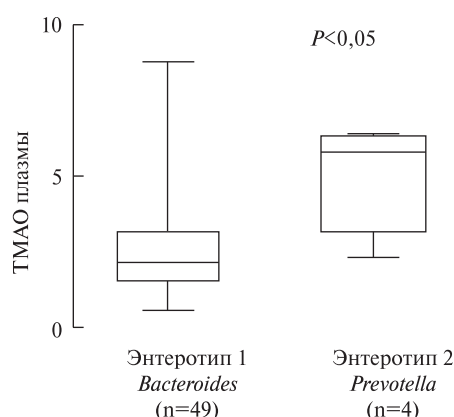


Рис. 4 Плазменный уровень ТМАО и энтеротипы микробиоты [25].

Roseburia, обеспечивающие продукцию таких противовоспалительных веществ, как ликопен и β -каротин. Таким образом, в пределах метагенома, гены, включенные в метаболизм пептидогликанов, выявлены у пациентов с атеросклерозом, тогда как гены, включенные в синтез противовоспалительных молекул (например, бутират), и антиокислители выявлены в группе контроля, предполагая, что метагеном может способствовать развитию симптоматического атеросклероза, действуя как регулятор воспаления у хозяина [26].

Несмотря на то, что проведенные исследования не могут предоставить точные данные прямых причинно-следственных связей, их результаты, однако, уже указывают на влияние кишечного метагенома на развитие симптоматического атеросклероза.

ТМАО и риск развития ССЗ

В исследованиях последних лет изучена также связь концентрации сывороточного L-карнитина и ТМАО с развитием поражения коронарных и периферических артерий, а также с риском развития ССЗ в целом у 2595 пациентов в одном [10] и у 4007 пациентов в другом [13] исследовании.

Проведенный анализ показал значительную ассоциацию между уровнем L-карнитина и риском распространенного поражения коронарных, периферических сосудов и с ССЗ в целом ($p < 0,05$). Кроме того, эти ассоциации остались сильными после поправки на традиционные факторы риска ССЗ ($p < 0,05$). Выявлено, что плазменные уровни L-карнитина были выше при стенозе коронарных артерий $\geq 50\%$, по данным коронароангиографии, независимо от количества пораженных сосудов ($p < 0,001$) [10].

Исследовано влияние L-карнитина на ССЗ: смерть, ишемическую болезнь сердца, инфаркт миокарда и реваскуляризацию за 3 года исследования. Выявлено, что повышенный уровень карнитина (4-й квартиль) был независимым предиктором ССЗ, даже после поправки на традиционные факторы риска ССЗ. Однако после дальнейшей поправки на уровень

ТМАО, показатели сопутствующих заболеваний (например, степень поражения коронарных сосудов, показатель фракции выброса, скорость клубочковой фильтрации), и принимаемые препараты, такие как ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, статины, β -адреноблокаторы и аспирин, корреляционная связь между уровнем карнитина и риском ССЗ уменьшилась [10].

Значительная ассоциация между уровнем плазменного карнитина и риском развития ССЗ выявлена с помощью регрессионной модели Кокса, однако такая связь существовала только при высоком уровне ТМАО ($p < 0,001$) [10].

Следовательно, в то время как казалось, что с риском и развитием ССЗ связаны плазменные уровни карнитина, настоящие результаты показали, что связь существует только при наличии повышенного уровня ТМАО, а не с наличием диетического содержания карнитина.

В исследовании [13] продолжительностью 3 года ($n=4007$) установлено, что повышенный уровень ТМАО в плазме крови ассоциирован с увеличением риска серьезных ССЗ в 2,54 раза. ССЗ в данном исследовании были зарегистрированы также при заболеваниях коронарных или периферических артерий, коронарной или периферической реваскуляризации, стенозе на $>50\%$ одной и более артерий при коронароангиографии или при наличии ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда. После проведенного анализа, выявлено, что у участников с ССЗ уровень ТМАО был достоверно выше и составил 5,0 мкМ [3,0;8,8] vs 3,5 мкМ [2,4;5,9]; ($p < 0,001$) по сравнению с пациентами без этих проявлений. Даже после поправки на традиционные факторы риска повышенные уровни ТМАО оставались сильным предиктором риска неблагоприятных ССЗ. Когда неблагоприятные события были проанализированы отдельно, выявлено, что увеличенные уровни ТМАО оставались значительно связанными с повышенным риском смерти: относительный риск (ОР) 3,37; 95% доверительный интервал (ДИ) 2,39; 4,75 ($p < 0,001$) и инфарктом миокарда: ОР 2,13; 95% ДИ 1,48; 3,05 ($p < 0,001$).

Прогностическое значение повышенных уровней ТМАО для сердечно-сосудистого риска оставалось значительным даже в подгруппах молодых пациентов (<65 лет), женщин и участников без ССЗ в анамнезе, с низким уровнем липидов и а-липопротеина, нормальным уровнем артериального давления, не курящих и с низким уровнем других известных маркеров риска, таких как С-реактивный белок, миелопероксидаза и количество лейкоцитов крови [13].

Заключение

Таким образом, данные последних исследований выявили, что L-карнитин и холин, получае-

мые с пищей, используются микрофлорой кишечника для синтеза триметиламина, который быстро окисляется флавиномоноксигеназой в печени до ТМАО, вызывающего развитие атеросклероза и повышающего риск развития ССЗ. В связи с чем ТМАО может стать предиктором риска возникновения неблагоприятных ССС независимо от наличия или отсутствия традиционных факторов риска, и присутствия или степени поражения коронарных артерий.

Литература

1. Strazhesko I, Akasheva D, Dudinskaya E, Tkacheva O. Vascular ageing: main symptoms and mechanisms. *Cardiovascular Therapy and Prevention* 2012; 11(4): 93-100. Russian (Стражеско И.Д., Акашева Д.У., Дудинская Е.Н., Ткачева О.Н. Старение сосудов: основные признаки и механизмы. Кардиоваскулярная терапия и профилактика 2012; 11(4): 93-100).
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-9.
3. Bernstein AM, Sun Q, Hu FB, et al. Major dietary protein sources and risk of coronary heart disease in women. *Circulation* 2010; 122: 876-83.
4. Micha R, Wallace S, Mozaffarian D. Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2010; 121: 2271-83.
5. Siri-Tarino P, Sun Q, Hu F, et al. Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 535-46.
6. Wang Z, Klipfell E, Bennett B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011; 472: 57-63.
7. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 4586-91.
8. Glass CK and Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metabolism* 2012; 15(5): 635-45.
9. Snel M, Jonker J, Schoones J, et al. Ectopic Fat and Insulin Resistance: Pathophysiology and Effect of Diet and Lifestyle Interventions. *Internat J Endocrinol* 2012; (2): 1-18.
10. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 2013; 19: 576-85.
11. Rebouche C, Mack D, Edmonson P, et al. L-Carnitine dissimilation in the gastrointestinal tract of the rat. *Biochemistry* 1984; 23: 6422-6.
12. Rebouche C, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Ann Rev Nutr* 1998; 18: 39-61.
13. Tang W, Wang Z, Levison B, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2013; 368(17): 1575-84.
14. Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, et al. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010; 156 (11): 3216-23.
15. Key TJ, Fraser GE, Thorogood M, et al. Mortality in vegetarians and nonvegetarians: detailed findings from a collaborative analysis of 5 prospective studies. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 516S-24.
16. Huang T, Yang B, Zheng J, et al. Cardiovascular disease mortality and cancer incidence in vegetarians: a meta-analysis and systematic review. *Ann Nutr Metab* 2012; 60: 233-40.
17. US Department of Agriculture and US Department of Health and Human Services. Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the dietary guidelines for Americans, 2010. Available at: <http://www.cnpp.usda.gov/DGAs2010-DGACReport.htm>. Accessed on August 31, 2010
18. Tuso P, Ismail M, Ha B, et al. Nutritional update for physicians: plant-based diets. *Perm J* 2013; 17: 61-6.
19. Takahashi Y, Sasaki S, Okubo S, et al. Blood pressure change in a free-living population-based dietary modification study in Japan. *J Hypertens* 2006; 24: 451-8.
20. Ornish D, Brown S, Scherwitz L, et al. Can lifestyle changes reverse coronary heart disease? The Lifestyle Heart Trial. *Lancet* 1990; 336: 129-33.
21. de Lorgeril M, Salen P, Martin J. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99: 779-85.
22. Zeisel S, Mar M, Howe J, et al. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J Nutr* 2003; 133: 1302-7.
23. Demarquoy J, Georges B, Rigault C, et al. Radioisotopic determination of L-carnitine content in foods commonly eaten in western countries. *Food Chem* 2004; 86: 137-42.
24. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *N Engl J Med* 2013; 368 (14): 1279-90.
25. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (New York)* 2011; 334: 105-8.
26. Karlsson F, Fak F, Nookaew I, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* 2012; 3: 1245.